厌氧污泥颗粒化中微生态形成过程表征

彭剑峰¹,宋永会^{1*},刘然^{1,2},王毅力²,袁鹏¹,高红杰¹

(1. 中国环境科学研究院城市水环境研究室,北京 100012;2. 北京林业大学环境科学与工程学院,北京 100083)

摘要:采用荧光原位杂交(FISH)和聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术,表征了厌氧污泥颗粒化过程中微生物种群多样性及群落相似性的变化,解析了关键微生物中产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌及产甲烷菌的动态演替,初步探讨了 颗粒污泥微生态群落的形成过程.结果表明,正常启动的厌氧反应器中,颗粒污泥生长周期超过 180 d,COD 去除率稳定需 50 d,而微生态结构稳定仅需 33 d.污泥颗粒化过程中,微生物 Shannon-Wiener 多样性指数先增加到 3.11 后降低到 2.88,群落相 似性逐渐由 44% 增长到 86%,微生物群落经历了一个"适应→增长→稳定"的 3 阶段演替过程.在污泥颗粒化初期,古细菌中 产甲烷菌率先快速生长,与产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌的相对丰度比高达42:2:1;而随着颗粒污泥微生态群落结构逐渐成 熟,最终产甲烷菌、产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌的相对丰度稳定在2.8:2.4:1.0.

关键词:厌氧反应器;颗粒污泥;颗粒化;启动;微生态;群落演替

中图分类号:X172; X703.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)07-2013-06

Forming Processes of Micro-Ecology in Anaerobic Sludge Granulation

PENG Jian-feng¹, SONG Yong-hui¹, LIU Ran^{1, 2}, WANG Yi-li², YUAN Peng¹, GAO Hong-jie¹

(1. Department of Urban Water Environmental Research, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: By use of the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) methods, the diversity and similarity of microbial community during anaerobic sludge granulation were studied. The relative abundance and their succession of H_2 -producing acetogens (HPA), homoacetoges (HOMA) and methanogens were monitored. And the whole forming processes of micro-ecology were investigated correspondingly. The results showed that for an anaerobic reactor during normal startup, only through 33-days continuous operation, the healthy microecology of granular sludge could be formed, which is much less than the growth period of granular sludge (> 180 d) and the time for achieving good COD removal (about 50 d). During the granulation processes of anaerobic sludge, the Shannon-Wiener diversity index of the microbial community increased firstly to 3. 11 and then decreased to 2. 88, and their similarity increased from 44% to 86% continuously. It is through these three stages, namely the adaptive stage, the growth stage and the stabilization stage in turn, the stable microecology could be formed gradually. In the initial granulation stage, the methanogens had a higher growth speed, resulting in methanogens, HPA and HOMA studied being produced in a ratio of approximately 42:2:1, respectively. However, with the healthy mocroecology been formed gradually, the ratio of methanogens to HPA and HOMA decreased to 2. 8:2. 4:1.0 finally.

Key words: anaerobic reactor; granular sludge; granulation; startup; microecology; community succession

厌氧颗粒污泥能够有效提升厌氧反应器对难降 解有机物的处理效能,提升反应器抗冲击负荷能力, 提高反应器抗酸化水平,已逐渐成为高效厌氧反应 器中必不可少的填料形式,也已成为衡量高效厌氧 污水处理工艺成功启动和稳定运行的重要标 志^[1,2].

厌氧污泥的颗粒化过程本身也就是一个相对独 立微生态系统的形成过程.污泥颗粒中不仅要逐渐 分层形成具有不同世代期及环境敏感性、包含多种 功能菌(如:水解发酵菌、产氢产乙酸菌、耗氢产乙 酸菌和产甲烷菌等)的微生物群落,还要逐渐形成 相互制约、互相影响、动态平衡的多种群链式协同代 谢模式^[3~6].只有培育出大量具有健康微生态系统 的厌氧颗粒污泥,反应器才能表现出较高的处理效 率及稳定性,并具有良好的抗冲击及抗酸化性能.整 个污泥颗粒化过程非常复杂,通常需要2~3个月的 时间^[7~9].相应地,加强厌氧污泥颗粒化中微生态形 成过程的研究,对了解污染物代谢过程、提升厌氧反 应器运行效率均具有重要作用.

近年来,加快厌氧污泥颗粒化进程、提升反应器 运行效率及稳定性逐渐成为高效厌氧处理工艺的研 究热点^[10].然而,目前大部分研究侧重于对颗粒污 泥结构及形态的表征,而对污泥微生态的研究主要 基于 SEM 技术分析微生物菌群的分布^[11~13].相关

基金项目:国家自然科学基金项目(50708101);国家水体污染控制 与治理科技重大专项(2008ZX07208-003)

收稿日期:2010-08-22;修订日期:2010-11-18

作者简介:彭剑峰(1977~),男,博士,副研究员,主要研究方向为 污水厌氧处理, E-mail:pjf1995@163.com

^{*} 通讯联系人, E-mail: songyh@ craes. org. cn

研究可有效探索微生物菌群的静态分布,但无法全 面掌握污泥颗粒化过程中微生物群落的动态演替, 尤其无法说明在污染物厌氧消化过程中起核心作用 的产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌及产甲烷菌的生长 过程及代谢制约关系,因而难以指导厌氧反应器污 泥颗粒化过程出现的各类启动问题^[14~17].

本研究应用 FISH 和 PCR-DGGE 等技术对厌氧 污泥颗粒化中微生态形成过程进行了动态表征,探 索了颗粒污泥中产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌及产 甲烷菌群落间的制约关系,以期为加快厌氧反应器 污泥颗粒化效率,提高污泥抗冲击及抗酸化性能提 供支撑.

1 材料与方法

1.1 实验装置

研究中采用的实验装置为 5 隔室的 ABR 高效 厌氧反应器.反应器总体积为 16.5 L,设计水力停留 时间 20 h,实验期间整个装置保持恒温(35 ±1)℃. ABR 反应器采用变流量和变浓度联合启动的方式. 启动初期 COD 负荷仅为 0.21 kg/(m³·d),当 COD 去除率达到 80% 时提升进水流量和进水浓度约 20%.该种启动方式初期气流和水流速较低,有利于 颗粒污泥的生长及保持.

1.2 实验材料

接种污泥由 A²/O 工艺中厌氧段的活性污泥和 养猪废水厌氧消化污泥组成. A²/O 工艺的厌氧污泥 取自北京肖家河污水处理厂,污泥呈絮状,沉降性能 差,MLVSS/MLSS 为 67%;养猪废水厌氧消化污泥 取自北京大兴区某养猪场,污泥含杂质较多, MLVSS/MLSS 为 40%.

ABR 反应器采用人工配水.由葡萄糖、碳酸铵和 磷酸二氢钾提供相应的碳、氮和磷源,正常运行时配 水 COD 为2 000 mg/L,COD: N: P = 235:5:1,并适量补 充 Mg、Fe、Co、Ni 等微量元素. 反应器进水以 NaHCO₃ 调节碱度,保证进水 pH 值在 6.8 ~ 7.5 之间.

1.3 取样及水质分析方法

分别在启动第 0、2、10、17、26、33、40、49、 60、69 d 取 ABR 反应器第一隔室样品. 取样后按照 常规方法检测污泥的 MLSS、MLVSS、SVI 等指标;部 分混合样品经离心分离、过滤后检测上清液的 COD;新鲜的颗粒污泥样品于4 ℃恒温下、经4%多 聚甲醛固定过夜后保存备用^[18].

颗粒粒度分析方法:每个样品取 2 mL 颗粒污 泥,在 Olympus 显微镜下观察,记录每个颗粒的长度 和宽度,然后依据 Sauter 公式计算颗粒平均粒 径^[19].

Sauter 公式:

$$D = 1/n \sum (ab^2)^{1/3}$$

其中,D为颗粒直径,mm;a为颗粒长度,mm;b为颗 粒宽度,mm;n为测定的颗粒污泥数目.

1.4 微生物分析方法

研究中着重分析污泥颗粒化过程中具有重要作 用的产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌和产甲烷菌.这几 种功能菌群分支众多,很难用一种单一探针来检测所 有的目标微生物,因此对每一种功能菌群选用1~2 种常见的探针来表征.采用 SYN700、WOL223 这2种 探针的组合来表征食丁酸产氢产乙酸菌和食乙酸产 氢产乙酸菌;采用 AW 探针表征耗氢产乙酸菌和食乙酸产 氢产乙酸菌;采用 AW 探针表征耗氢产乙酸菌和食乙酸产 菌群中的 Methanomicrobiales.此外,采用 EUB338 探针 表征真细菌,采用 ARCH915 表征古细菌.厌氧污泥中 的发酵产酸菌、产氢产乙酸菌、耗氢产乙酸菌属于真 细菌,而产甲烷菌属于古细菌.探针用荧光染料 TAMRA 或 FITC 在 5′端标记,其合成和标记均由大连 宝生物公司完成.探针的详细情况见表1^[20,21].

表 1 FISH 实验中的寡核苷酸探针

Table 1 105 HUVA-targeted ongonucleonde probes used in F1511 experiment			
探针名称	序列 (5' to 3')	目标微生物	荧光染色剂
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	真细菌	TAMRA
ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	古细菌	FITC
SYNM700	ACT GGT RTT CCT CCT GAT TTC TA	食丁酸盐产氢产乙酸细菌	TAMRA
WOL223	ACG CAG ACT CAT CCCC GTG	食丙酸盐产氢产乙酸细菌	FITC
AW	GGC TAT TCC TTT CCA TAG GG	耗氢产乙酸菌	FITC
MG1200	CGG ATA ATT CGG GGC ATG CTG	产甲烷菌	TAMRA

污泥样品中微生物相的观察采用 Olympus 荧光 显微镜.

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-

DGGE): DNA 提取方法采用基于 SDS 的裂解 法^[20, 22,23]. DGGE 在 Dcode 系统上进行,电泳后以1 × SYBR Gold 染色 30 min,用 GSD 8000 成像系统观 察结果和照相,以 Bio-Rad Quantityone 软件分析 DGGE 图谱,利用 Shannon-Wiener 指数计算各样品 的种群多样性^[18, 22,23].

族群归属分析:以 Quantityone 软件中的 UPGMA (The unweighted pair group method with arithmetic averages)算法对样品进行聚类分析,利用 MEGA4.1 软件,以邻接法(neighbor-joining, NJ)绘 制系统发育树^[18, 22].

2 结果与讨论

2.1 启动阶段 COD 去除效果

ABR 反应器采用变流量和变浓度联合启动的 方式.由图1可知,厌氧反应器启动过程中 COD 去 除率呈"快速增长、缓慢平衡"的变化形式.在启动 前50 d,随着进水负荷由0.2 kg/(m³·d)增长到0.4 kg/(m³·d),COD 去除率由75%逐步升高到95%, 出水 COD <100 mg/L;在启动的第50~180 d,尽管 COD 负荷逐渐增加到2.0 kg/(m³·d),COD 去除率 持续稳定在95%左右,出水 COD 稳定在20~50 mg/L之间.在180 d的启动及运行过程中,ABR 反 应器仅需50 d即达到较佳运行效果.因而厌氧反应 器启动顺利,微生物种群的变化能够反映正常污泥 颗粒化中微生态的形成过程.



图1 反应器启动过程 COD 变化

Fig. 1 Variation of COD in the whole start-up stage

2.2 颗粒污泥生长过程分析

正常启动 ABR 反应器中颗粒污泥的平均粒度 变化如图 2 所示.

由图 2 可知,在 ABR 反应器顺利启动及稳定运 行的 180 d 中,颗粒污泥的粒径长期持续增长.在启 动前 10 d,反应器内污泥仍以结构松散的絮状污泥 为主;启动 25 d 后,污泥中出现了大量形状不规则、 结构密实的黑色球形小颗粒,污泥平均粒径逐渐增 长到 0.7 mm;在启动 50 d、平均粒径增长到 1.3 mm







时,污泥颗粒化速率开始明显降低,镜检结果显示颗 粒态污泥已成为厌氧反应器中污泥的重要形态;启 动约180 d时,颗粒粒径增大到接近2.0 mm,颗粒 呈现为形态规则的球形.因而,ABR反应器启动及 运行初期厌氧颗粒污泥粒径的增长是一个长期持续 的过程,远超出 COD 指标仅50 d 的稳定周期.

2.3 微生物种群多样性变化

微生物种群多样性是表征微生物群落演替的重 要指标.研究中基于 Shannon-Wiener 多样性指数分 析,探索了厌氧反应器启动过程中微生物种群变化, 结果见图 3.





由图 3 可知, 厌氧反应器启动过程中微生物种 群多样性先增加后降低, 而未直接快速减小^[27]. 接 种初期微生物正在适应反应器内的新环境, 大部分 微生物活性受到抑制, 因而 Shannon-Wiener 指数相 对稳定并略有降低;随着微生物对环境的逐渐适应, 微生物种群多样性快速增高, 到接种第 40 d 时 Shannon-Wiener 指数达到最大值 3.11;随着优势微 生物群落的形成, Shannon-Wiener 指数又逐渐降低 并在第 60 ~ 69 d 时稳定在 2.88 左右.因而,反应器 启动过程中,厌氧微生物群落经历了"适应→增长 →稳定"的 3 阶段演替过程,最终形成了与反应器 环境相适宜、群落稳定的厌氧微生态系统.

2.4 族群归属分析

为进一步揭示厌氧污泥颗粒化中微生物群落的 逐渐演替过程,研究中以 Quantityone 软件的 UPGMA 算法对微生物群落进行了聚类分析,系统树 如图4所示.

聚类分析结果表明,厌氧污泥颗粒化过程中微 生物群落展现出明显的结构性演替,表现出与微生 物群落多样性相适宜的 3 阶段变化. 接种污泥为污 水处理厂和养猪废水厌氧单元的混合污泥,具有独 特的微生物群落结构;随着培养的进行,适应环境条 件的优势微生物种群大量繁殖,微生物群落结构逐 渐改变. 到第 33 ~40 d 时,颗粒污泥形成了相对稳 定的微生物群落,Shannon-Wiener 多样性指数也达 到最大值,群落结构的相似性也随之增加. 而后,随 着优势微生物群落的逐渐稳定,反应器内形成相对 一个稳定的微生态系统,微生物群落相似性达到 86%.



图 4 基于戴斯指数的 UPGMA 聚类分析 Fig. 4 Cluster analysis of microbes DGGE by UPGMA

2.5 微生物群落演替

厌氧微生物主要由真细菌和古细菌组成,其中 厌氧消化的3大核心微生物菌群,即发酵产酸菌、产 氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌属于真细菌,而产甲烷 菌属于古细菌^[24,25].前人已对发酵产酸菌进行了大 量研究,本研究主要表征了污泥颗粒化过程中耗氢 产乙酸菌、产氢产乙酸菌和产甲烷菌等3种关键微 生物种群的动态演替.图5为启动过程中某一阶段 的微生物菌群 FISH 分析结果.

图 5 中 DAPI 染色结果展示了样品中所有细胞,包括死细胞. 而 EUB338、ARCH915 和 MG1200



a. 真细菌; b. 古细菌; c, d. 食丁酸产氢产乙酸菌和食乙酸产氢产乙酸菌; e. 耗氢产乙酸菌; f. 产甲烷菌 A、B、C、D、E、F. 样品所有细胞,包括死细胞 图 5 启动 60 d 时微生物菌群 FISH 结果 Fig. 5 FISH analysis of microbial community through 60 d cultivation 接种污泥中死亡细胞较多,古细菌的相对丰度 为(27.4±0.3)%,略高于真细菌约(19.9±0.2)% 的相对丰度,两者之和不足 50%.而随着厌氧反应 器启动时间的延长,古细菌和真细菌获得了充足的 有机底物,开始快速生长并占据主体.反应器启动约 33 d时,颗粒污泥微生态结构即趋于稳定,真细菌 相对丰度增长了 170%,古细菌相对丰度增长了 290%.颗粒污泥微生态结构稳定后,厌氧微生物全 部由真细菌(58.3±0.7)%和古细菌(46.2± 0.1)%组成,真细菌成为优势微生物.





Fig. 6 Abundance succession of the microbial community throughout start-up stage

分析污泥颗粒化过程中所研究的产氢产乙酸菌 (采用 SYNM700 及 WOL223 探针部分表征)、耗氢 产乙酸菌(采用 AW 探针部分表征)以及产甲烷菌 (采用 MG1200 探针表征)的变化可知,反应器启动 初期厌氧污泥中未检测到产氢产乙酸菌和耗氢产乙 酸菌,仅检测到少量的产甲烷菌(0.3 ± 0.002)%, 此时接种污泥微生态结构严重受损,厌氧消化过程 无法正常进行.启动 17 d 后,反应器内检测出了产 氢产乙酸菌(0.4 ± 0.2)% 和耗氢产乙酸菌(0.2 ± 0.02)%,且产甲烷菌、产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸 菌的丰度比值达42:2:1,厌氧消化过程开始逐步恢 复^[26];而随着启动时间的延长,产氢产乙酸菌快速 生长,启动 33 d 时 3 种微生物群落比值约 2.6:2.3:1,微生物群落结构开始保持相对稳定;在 随后的 40 d 启动及培养过程中,颗粒污泥微生物种 群结构变化不大,微生态系统相对稳定,所研究的3 种关键微生物菌群最终保持在2.8:2.4:1.0左右.

3 结论

(1)正常启动的厌氧反应器中,颗粒污泥生长 时间超过180 d,COD 去除率稳定需50 d,而微生态 结构稳定仅需要33 d.

(2) 厌氧反应器启动过程中, 微生物群落相似 性逐渐由44% 增长到86%, 而 Shannon-Wiener 指数 先增加到3.11 后降低到2.88, 厌氧微生物群落经 历了一个"适应→增长→稳定"的3 阶段演替过程, 最终形成了与反应器环境相适宜的微生态系统.

(3)颗粒污泥微生态结构稳定后,厌氧微生物 全部由真细菌(58.3±0.7)%和古细菌(46.2± 0.1)%组成,真细菌成为优势微生物.所研究的古 细菌在接种初期,产甲烷菌率先快速生长,与产氢产 乙酸菌和耗氢产乙酸菌的相对丰度比可达42:2:1; 而随着产氢产乙酸菌和耗氢产乙酸菌逐渐成长,颗 粒污泥微生态系统逐渐成熟,产甲烷菌、产氢产乙酸 菌和耗氢产乙酸菌丰度比最终稳定在2.8:2.4:1.0 左右.

参考文献:

- [1] 孙寓姣, 左剑恶, 邢薇, 等. 高效厌氧产甲烷颗粒污泥微生物多样性及定量化研究[J]. 环境科学, 2006, 27 (11): 2354-2357.
- [2] Grobicki A M W, Stuckey D C. Performance of the anaerobic baffled reactor under steady state and shock loading conditions
 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 37: 344-355.
- [3] 王建龙,韩英健,钱易.折流式厌氧反应器(ABR)的研究 进展[J].应用与环境生物学报,2000,**6**(5):490-498.
- [4] Ji G D, Sun T H, Ni J R, et al. Anaerobic baffled reactor (ABR) for treating heavy oil produced water with high concentrations of salt and poor nutrient [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1108-1114.
- [5] Wang J Q, Shen D S, Xu Y H. Effect of acidification percentage and volatile organic acids on the anaerobic biological process in simulated landfill bioreactors [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(7): 1677-1681.
- [6] Entürk E S, Ince M, Engin G O. Treatment efficiency and VFA composition of a thermophilic anaerobic contact reactor treating food industry wastewater [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 176: 843-848.
- [7] 李夕耀,彭永臻,王淑莹,等.聚磷菌厌氧时吸收乙酸和丙酸的代谢模型[J].环境科学与管理,2008,33(8):37-42.
- Uyanik S, Sallis P J, Anderson G K. The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR).
 Part II: compartmentalization of bacterial populations [J]. Water

Research, 2002, 36: 944-955.

- [9] Sallis P J, Uyanik S. Granule development in a split-feed anaerobic baffled reactor [J]. Bioresource Technology, 2003, 89: 255-265.
- [10] Lemaire R, Yuan Z, Blackall L L, et al. Microbial distribution of Accumulibacter spp. and Competibacter spp. in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(2): 354-363.
- [11] Mu Y, Yu H Q, Wang Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor [J]. Chemosphere, 2006, 64: 350-358.
- [12] Bhunia P, Ghangrekar M M. Required minimum granule size in UASB reactor and characteristics variation with size [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 994-999.
- [13] Wang S G, Liu X W, Gong W X, et al. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 2142-2147.
- [14] Zhou W L, Imai T, Ukita M, et al. Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1386-1392.
- [15] De Kreuk M K, Pronk M, Van Loosdrecht M C M. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures [J]. Water Research, 2005, 39: 4476-4484.
- [16] Ucisik A S, Henze M. Biological hydrolysis and acidification of sludge under anaerobic conditions: The effect of sludge type and origin on the production and composition of volatile fatty acids [J]. Water Research, 2008, 42: 3729-3738.
- [17] Alkaya E, Kaptan S, Ozkan L. Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid-liquid extraction [J]. Chemosphere,

2009, 77: 1137-1142.

- [18] 刘然,彭剑峰,宋永会,等. 厌氧折流板反应器酸化及其对 微生物种群分布的影响[J]. 环境科学,2010,31(7):1554-1560.
- [19] 芦家娟, 王毅力, 侯立安, 等. ABR 成熟颗粒污泥的分形特 征与尺度效应[J]. 环境科学, 2005, 26(4): 118-123.
- [20] 刘然,彭剑峰,宋永会,等. 厌氧折流板反应器(ABR)中微 生物种群演替特征[J]. 环境科学研究,2010,23(6):741-747.
- [21] 左剑恶,杨洋,沈平,等. 荧光原位杂交技术在厌氧颗粒污 泥研究中的应用[J]. 中国沼气,2004,22(1):3-6.
- [22] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316-322.
- [23] 任南琪,赵阳国,王爱杰,等. PCR-SSCP 技术分析碱度影响 下硫酸盐还原反应器中微生物群落动态[J]. 中国科学(C 辑):生命科学,2006,36(1):51-58.
- [24] Lima G D P, Sleep B E. The spatial distribution of Eubacteria and Archaea in sand-clay columns degrading carbon tetrachloride and methanol [J]. Journal of Contaminant Hydrology, 2007, 94 (1-2): 34-48.
- [25] Sun Y J, Zuo J E, Chen L L, et al. Eubacteria and Archaea community of simultaneous methanogenesis and denitrification granular sludge [J]. Journal of Environmental Science, 2008, 20(5): 626-631.
- [26] Taconi K A, Zappi M E, French W T, et al. Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(8): 1579-1585.
- [27] 张斌,孙宝盛,季民,等. MBR 中微生物群落结构的演变与 分析[J].环境科学学报,2008,8(11):2192-2199.